

心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性 蛋白リン酸化酵素に関する研究

II. イヌ冠動脈内 N^6 -2'-O-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate 投与の心行動態, 心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性蛋白リン酸化酵素に及ぼす影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

東京都養育院付属病院内科

坂 井 誠

(昭和60年3月29日受付)

N^6 -2'-O-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate (dibutyryl cyclic AMP) の心臓におよぼす生理作用を明らかにするために麻酔開胸犬の左冠動脈口に左鎖骨下動脈より灌流した Gregg のカニューレを挿入し, この回路より dibutyryl cyclic AMP を投与し, 心行動態, 心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性におよぼす影響を検討した。陽性変時および変力作用, 冠血流量の増加は投与後 15~20 分で最大となり, その効果は投与後少くとも 30 分間持続した。また 1.2~1.5 mg/kg の投与量で最大の効果を認めたが(心拍数増加率, 41%; 最大 dP/dt 増加率, 310%; 最大 dP/dt/P 増加率, 117%; 冠血流量増加率, 100%; 心筋酵素消費量増加率, 69%), それ以上の投与量ではその効果はかえって減弱した。dibutyryl cyclic AMP 投与 30 分後の心尖部心筋を切除し, 心筋ホモジェネートを作製した。その遠心上清を酵素抽出液として Sephadex G-100 ゲルろ過を行い, 心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素をホロ酵素(不活性型酵素, RC)と catalytic subunit(活性型酵素, C)に分離した。Sephadex G-100 ゲルろ過による蛋白リン酸化酵素活性比(総活性に対する活性型酵素の比, $C/(RC+C)$)は対照 0.29 に対し, dibutyryl cyclic AMP 2, 4, 10 mg/kg 投与の心筋では活性型酵素の増加により各々 0.38, 0.43, 0.51 と増加した。以上より dibutyryl cyclic AMP の心臓生理作用は心筋蛋白リン酸化酵素の活性化を通じて発現すると考えられた。この活性型酵素の増加は心筋ホモジェネートの顆粒分画より可溶性分画への translocation によると推定されたが, 顆粒各分画(核およびサルコレンマ, ミトコンドリア, マイクロゾーム)の蛋白リン酸化酵素活性は dibutyryl cyclic AMP 投与群においては対照と比べて変化なく, 顆粒分画からの translocation は明らかではなかった。

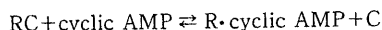
Key words カテコールアミン, cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP, 心筋
cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素, 陽性変力作用

一般にベプチドホルモンやカテコールアミンがホルモン作用を発現する際に, 標的細胞でまず adenylate cyclase を活性化し, 細胞内 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) 濃度の上昇を介して

発現することが知られている¹⁾。cyclic AMP は細胞内で蛋白リン酸化酵素のホロ酵素に作用し, 二つの subunit の一方の regulatory subunit (R) に結合して活性型の catalytic subunit (C) を遊離させて酵素活性を上

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; C, catalytic subunit of protein kinase; cyclic AMP, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate; DBcAMP and dibutyryl cyclic AMP, N^6 -2'-O-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate; dP/dt, first derivative of the left ventricular pressure; dP/dt/P, the ratio

昇させる。その活性化反応は次式のように考えられている²⁾³⁾。



さらにこの活性型のCがphosphorylase kinaseをはじめとして細胞内の種々の酵素や構造蛋白をリン酸化することによって情報を増幅拡大してホルモンの生理作用を発現すると考えられている。

カテコールアミンの心臓生理作用(陽性変力および陽性変時作用)も上述した経路をへて発現するが、外因性にcyclic AMPを投与した場合には、その細胞内への非透過性のために陽性変力作用、変時作用は生じ難い^{4)~7)}。一方、cyclic AMPの誘導体で膜透過性が高く、phosphodiesteraseに分解され難いN⁶-2'-O-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate (dibutyryl cyclic AMP)が*in vitro*^{8)~12)}, *in vivo*¹³⁾¹⁴⁾の動物心においてカテコールアミン類似作用を示すことはすでに報告され、ショック¹⁵⁾¹⁶⁾、心不全¹⁷⁾¹⁸⁾に対する臨床応用も試みられている。そこで著者は、dibutyryl cyclic AMPの臨床応用の前段階としてその心臓生理作用を明らかにするために、イヌ冠動脈内にdibutyryl cyclic AMPを投与し、心血行動態におよぼす影響および心筋cyclic AMP依存性蛋白リン酸化酵素の賦活化との関係を解明することを目的として以下の研究を行った。

材料および方法

体重10~18 kgの雑種成犬30頭を用い、カルシウムベントバルビタール30 mg/kgの静脈内投与により麻酔し、人工呼吸下に開胸した。左冠動脈口に左鎖骨下動脈より灌流したGreggのカニューレを挿入し、この回路および下行大動脈に血流計プローベを装着し、電磁流量計(日本光電MF-46)にて冠血流量、大動脈血流量を測定した。冠静脈洞および大腿動脈より経時的に採血し、O₂含量を測定した。

心収縮力の指標として左室穿刺による内圧波形より横軸に内圧P、縦軸にdP/dt、dP/dt/Pをオシロスコープ(三栄測器2G51)上に一種のforce velocity loopとして描写させ、その最大の高さを最大dP/dt、dP/dt/Pとして測定記録した(図1)。

輸血を行いながら左冠動脈内にdibutyrylcyclic AMP投与後、各指標を経時的に記録し、30分後心尖部心筋を切除し、直ちに液体窒素で凍結させた。冷凍保存した心筋の前壁の一部を重量1 g当たり3倍の

20 mM リン酸カリウム (pH 7.0), 5 mM EDTA, 0.25 M 塩化ナトリウム, 1 mM テオフィリンで4℃下テフロンガラスホモジナイザーで均質にし、20分間29,000×gで遠心し、この上清を酵素抽出液とした。この酵素抽出液0.6 mlを20 mM リン酸カリウム, 5 mM EDTA, 0.25 M 塩化ナトリウム, 1 mM テオフィリンで平衡させた0.9×30 cmのSephadex G-100カラムにかけ心筋蛋白リン酸化酵素を不活性型酵素(ホロ酵素, RC), 活性型酵素(catalytic subunit, C)に

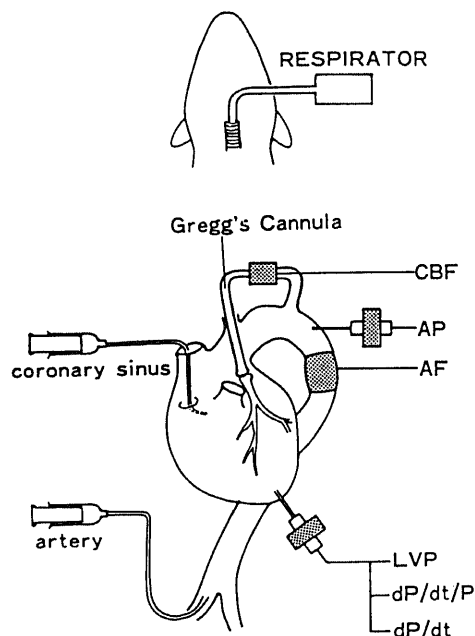


Fig. 1. Schematic presentation of experimental preparation of dog.

The left coronary artery was perfused from the left subclavian artery through the Gregg's cannula. Coronary blood flow (CBF) was measured by electromagnetic flow meter (Nihon Kohden MF 46) placed in the perfusion circuit. Aortic flow (AF) was also measured at the thoracic aorta. Oxygen content of arterial and coronary sinus blood were analyzed by the oxygen content analyzer (Lexington). Aortic and left ventricular pressure (AP and LVP) were obtained by direct puncture with the needle connected to the pressure transducer (Sanei Sokki 180-4), and dP/dt and dP/dt/P were derived by differentiation of LVP.

of the rate of rise of ventricular pressure to the simultaneous left ventricular pressure; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HR, heart rate; R, regulatory subunit of protein kinase; RC, holoenzyme of protein kinase.

分離した。蛋白リン酸化酵素活性の測定は前述の方法¹⁹⁾で行った。なお反応時間は15分とし、反応溶液中に加える cyclic AMP は $5 \mu\text{M}$ とした。

なお、一部の実験では左冠動脈内にカテコールアミン (エピネフリン, イソプロテレノール) を投与し、血行動態各指標を経時的に記録した。

dibutyl cyclic AMP, エピネフリンは第一製薬, イソプロテレノールは日研科学, Sephadex G-100 は Pharmacia 社から得た。

成 績

1. dibutyl cyclic AMP の血行動態におよぼす影響

図2に顕著な陽性変時, 変力作用を認めた例の実験結果を示す。冠動脈内に dibutyl cyclic AMP 1.2 mg/kg という少量投与で心拍数, 冠血流量, 心収縮力

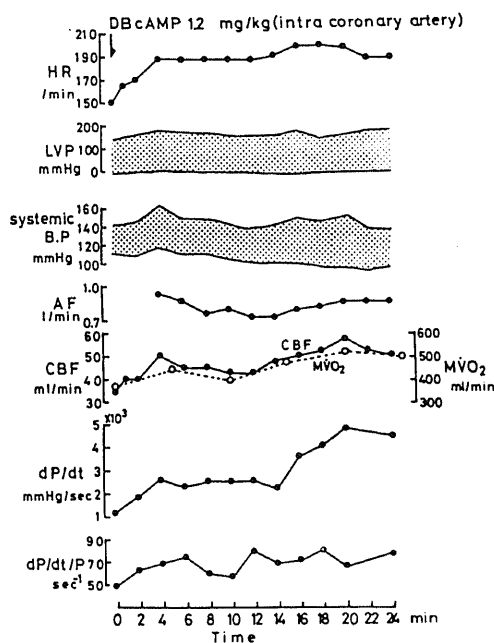


Fig. 2. Changes of hemodynamics after coronary injection of 1.2 mg/kg of dibutyl cyclic AMP (DBcAMP).

Abbreviations; HR, heart rate; LVP, left ventricular pressure; systemic BP, systemic blood pressure; AF, aortic flow; CBF, coronary blood flow; MVO_2 , myocardial oxygen consumption; dP/dt , first derivative of the left ventricular pressure; $dP/dt/P$, the ratio of the rate of rise of ventricular pressure (dP/dt) to the simultaneous left ventricular pressure (P).

は漸増しながら15~20分で最大に達し、各々のピークの%増加率は心拍数41%, 冠血流量64%, 心筋酸素消費量45%, 最大 dP/dt 310%, 最大 $dP/dt/P$ 65%であった。一方、血圧、大動脈血流量はほぼ不変であった。dibutyl cyclic AMPの投与量と血行動態諸指標との関係では最大 dP/dt , 最大 $dP/dt/P$, 冠血流量, 心筋酸素消費量の%変化率は1.5 mg/kg 前後をピークとしてそれ以上では漸減し、4 mg/kg では陽性変力作用、冠血流量の増加を認めなかった。平均血圧、大動脈血流量は4 mg/kgの投与量以内で各々 $\pm 10\%$, $\pm 40\%$ 以内の変動を示した(図3)。

2. エピネフリン, イソプロテレノールと dibutyl cyclic AMP 投与前後の血行動態の比較

至適量の dibutyl cyclic AMP はエピネフリン, イソプロテレノール等のカテコールアミンと同程度の最大 dP/dt , 最大 $dP/dt/P$ の増加を示したが、心拍数の増加率はカテコールアミンの約1/2であった(表1)。すなわち dibutyl cyclic AMP はカテコールアミンと同程度の陽性変力作用を有するが、変時作用はカテコールアミンに比し弱かった。またそれらの最大効果の発現はカテコールアミンでは投与後30秒前後であるのに比べ、dibutyl cyclic AMP は約20分と長時間を要した。

3. dibutyl cyclic AMP の蛋白リン酸化酵素活性におよぼす影響

1) *in vitro* における効果

偽手術より得た心筋ホモジェネートに0.1~100 mM の dibutyl cyclic AMP を加え、 $29,000 \times g$ で20分間遠心し、その上清につき蛋白リン酸化酵素活性を測定した(表2)。dibutyl cyclic AMP 濃度の増加とともに cyclic AMP 非添加時活性 ($-cAMP$) は99から318 nmoles/g tissue/15分と有意に増加し、総活性 ($+cAMP$) は456から394 nmoles/g tissue/15分と減少傾向を示し、蛋白リン酸化酵素活性化 ($-cAMP/+cAMP$) は0.2から0.8と増加した。

2) *in vivo* における効果

図4に、対照および dibutyl cyclic AMP を総量20 mg, 40 mg, 100 mg, 冠動脈内に投与した際の心筋蛋白リン酸化酵素の Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。図右上に示すように蛋白リン酸化酵素のホロ酵素 RC は活性型酵素である catalytic subunit より分子量が大きいため早期に溶出した。Corbin ら²⁰⁾の方法に従い、cyclic AMP 添加により活性化されない、すなわち白丸と黒丸が一致する第2のピークを基線上に外挿し、この面積をCとすることにより溶出パターン全面積におけるCの割合 ($C/(RC+C)$)、すなわち蛋白リン酸化酵素活性比を

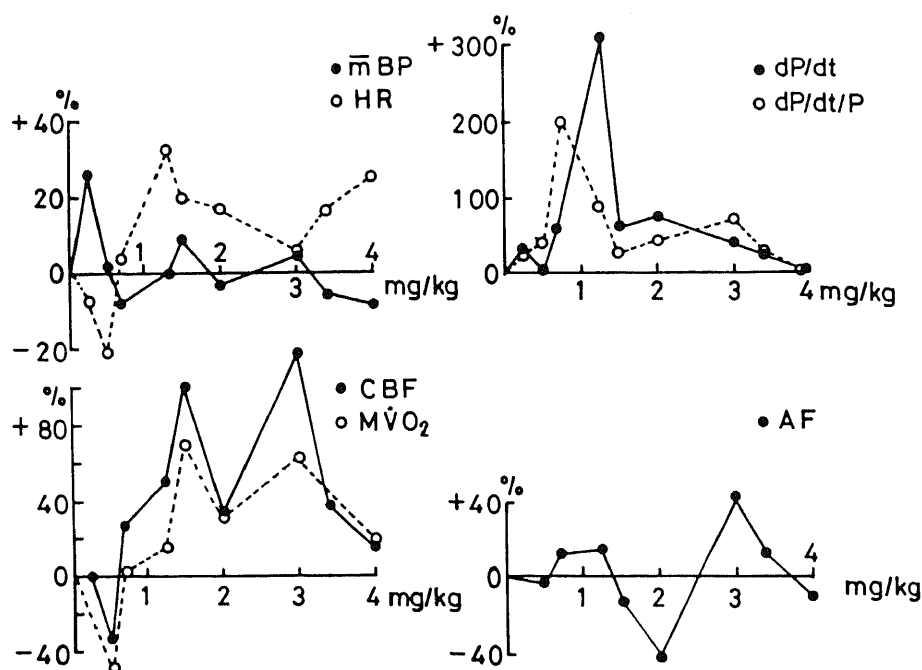


Fig. 3. Percent changes of hemodynamics at various doses of dibutyl cyclic AMP.

Vertical axis represents percent changes of hemodynamics and horizontal axis represents dose of dibutyl cyclic AMP. Abbreviations; mBP, mean blood pressure; HR, dP/dt, dP/dt/P, CBF, MVO₂ and AF are the same as in Fig. 2.

Table 1. Comparison of epinephrine, isoproterenol and dibutyl cyclic AMP (DBcAMP) on heart rate and contractility

Drug/Dose	(n)	Preinjection	Postinjection	% increase	Time of peak
Epinephrine	(3)				(sec)
0.01~0.1 mg/kg	HR	158±7	284±4	82±8	45±6
	dP/dt	2108±550	9300±2308	367±58	40±5
	dP/dt/P	78±6	135±3	74±10	38±3
Isoproterenol	(3)				(sec)
0.01~0.04 mg/kg	HR	149±8	268±11	83±6	28±2
	dP/dt	1721±262	3291±324	125±24	23±2
	dP/dt/P	68±6	124±8	97±17	32±5
DBcAMP	(1)				(min)
1.2 mg/kg	HR	150	211	41	19
	dP/dt	1190	4880	310	20
	dP/dt/P	49	80	65	18

Mean±standard error of mean (S.E.M.) are shown only for the experiments of epinephrine and isoproterenol.

Abbreviations; HR, heart rate (beat/min); dP/dt, first derivative of the left ventricular pressure (mm-Hg/sec); dP/dt/P, the ratio of the rate of rise of ventricular pressure (dP/dt) to the simultaneous left ventricular pressure (P) (sec⁻¹).

Table 2. Effect of dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) *in vitro* on protein kinase activity of myocardial homogenate

DBcAMP mM	(n)	Protein kinase activity nmoles/g tissue/15 min		Protein kinase activity ratio (-cAMP/+cAMP)
		-cAMP	+cAMP	
0	(3)	99 ± 45	456 ± 68	0.20 ± 0.06
0.1	(3)	84 ± 33	446 ± 61	0.18 ± 0.05
1	(3)	122 ± 38	380 ± 64	0.32 ± 0.10
10	(3)	172 ± 40	363 ± 37	0.47 ± 0.08
100	(3)	318 ± 52*	394 ± 66	0.80 ± 0.05*

Some pieces biopsied by a liquid nitrogen cooled small clamp from anterior free wall of the dog heart were homogenized in ice cold 5 mM potassium phosphate (pH 7.0) containing 2 mM EDTA, 0.14 M NaCl, 2 mM theophylline and 5 mM mercaptoethanol. The homogenates containing from 0 to 100 mM dibutyryl cyclic AMP were prepared and centrifuged at $29,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatants were provided for protein kinase activity in the absence (-cAMP) or presence (+cAMP) of $5 \mu\text{M}$ cyclic AMP.

Mean \pm standard error of mean (S.E.M.) are shown.

Asterisk (*) indicates significant difference from control values by t test ($p < 0.05$).

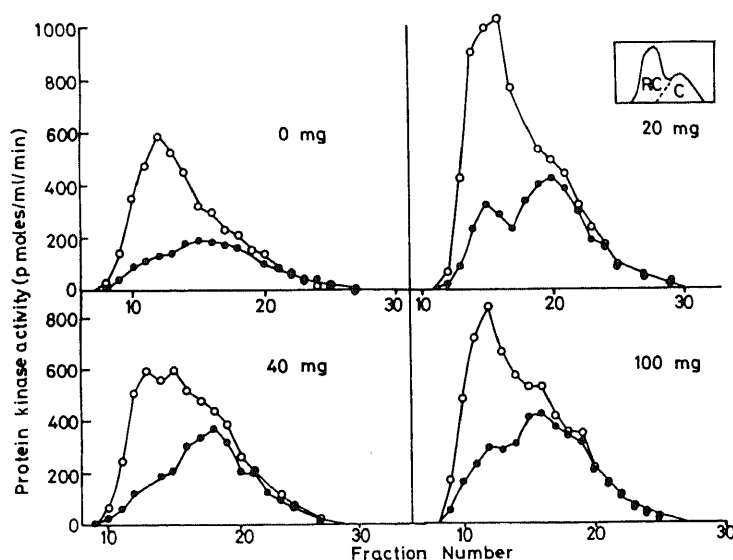


Fig. 4. Sephadex G-100 column chromatography at various doses of dibutyryl cyclic AMP. After 30 min of intracoronary injection of various doses of dibutyryl cyclic AMP, a large apical mass of the heart was rapidly excised and frozen immediately in liquid nitrogen. A piece of anterior free wall was crashed, homogenized in 3 volumes of ice cold 20 mM potassium phosphate (pH 7.0) containing 5mM EDTA, 0.25 M NaCl, 1 mM theophylline by a Teflon glass homogenizer and centrifuged at $29,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatant was saved and 0.6 ml of supernatant was applied to a column (0.9×30 cm) of Sephadex G-100 to separate holoenzyme (RC) and free catalytic subunit (C) of cyclic AMP dependent protein kinase. The Sephadex G-100 column was previously equilibrated with the homogenizing buffer. Fractions of 0.8 ml were collected and $50 \mu\text{l}$ was used for assay. Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of $5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. The inset on the right upper corner depicts the pattern of RC and C separated by the method of Corbin *et al*²⁰. The first peak stimulated by $5 \mu\text{M}$ cyclic AMP was assumed to be RC, whereas the second peak, which was independent on cyclic AMP, was assumed to be C. C was determined by extrapolating the second peak to the baseline on the ordinate and measuring the area of this peak. These areas were measured by cutting out and weighing the graph papers.

各投与量ごとに算出した。図5に示すように Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーにおいて求めた蛋白リン酸化酵素活性比は対照 0.29 に対し、投

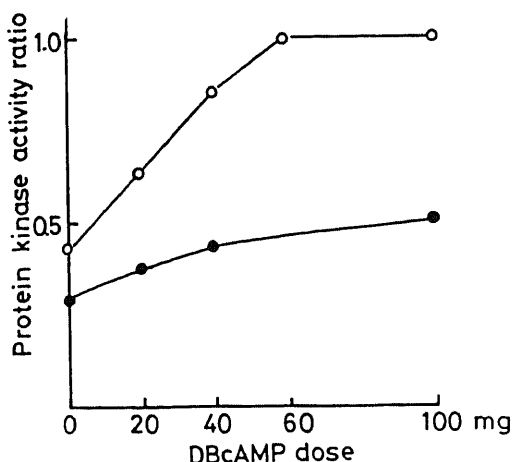


Fig. 5. Protein kinase activity ratio at various doses of dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP). The lower curve (●—●) represents protein kinase activity ratio ($C/(RC+C)$) obtained from Sephadex G-100 column chromatography. The upper curve (○—○) represents protein kinase activity ratio obtained from the supernatant assayed in the absence or presence of $5\mu\text{M}$ cyclic AMP.

Table 3. Subcellular distribution of protein kinase activity with and without injection of dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP)

	Protein kinase activity (nmoles/mg protein/10 min)			
	Control (n=3)		DBcAMP (n=3)	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
Homogenate	1.12 ± 0.19	3.99 ± 0.73	$2.22 \pm 0.40^*$	4.13 ± 0.65
Fractions:				
Nuclear and sarcolemmal	0.72 ± 0.24	2.53 ± 0.81	1.18 ± 0.37	2.49 ± 0.71
Mitochondrial	1.27 ± 0.18	4.12 ± 0.49	1.81 ± 1.41	5.61 ± 3.87
Microsomal	0.46 ± 0.09	0.79 ± 0.13	0.41 ± 0.08	0.71 ± 0.07
Soluble	0.77 ± 0.16	5.08 ± 0.89	2.24 ± 0.87	5.87 ± 1.35

A large apical mass of heart was excised after sham operation or intracoronary injection of 100 mg dibutyryl cyclic AMP. A piece of anterior free wall was immediately homogenized in 4 volumes of ice cold 20 mM potassium phosphate (pH 7.0) containing 5 mM EDTA, 0.25 M NaCl, 1 mM theophylline, 0.25 M sucrose by a Virtis homogenizer on ice. The homogenate was fractionated by the differential centrifugations at $1,000 \times g$ to give a crude nuclear and sarcolemmal fraction, at $22,000 \times g$ to obtain a mitochondrial fraction and at $100,000 \times g$ to separate the microsomal particles from the soluble supernatant. Each precipitate fraction was washed once with the homogenizing buffer and suspended in the same buffer. Each fraction was treated by diluting 1:1 with the homogenizing buffer containing 1% Triton and stored overnight on ice. Protein kinase activity was assayed in each subcellular fraction with histone as substrate in the absence (-cAMP) or presence (+cAMP) of $5\mu\text{M}$ cyclic AMP.

Mean \pm standard error of mean (S.E.M.) are shown.

Asterisk (*) indicates significant difference from control values by t test ($p < 0.05$).

与総量 20, 40, 100 mg 心筋では各々 0.38, 0.43, 0.51 と投与量が増すに従い増加した。心筋ホモジネート遠心上清の蛋白リン酸化酵素活性化 (cyclic AMP 非添加時活性/総活性) も同様に増加したが, Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーで得られた値より高く, 上方に線を描いた。この差はホモジネート遠心上清に含まれるホロ酵素 RC の cyclic AMP に対する感受性が変化したためとも考えられるが, RC が測定中, 反応液中に含まれる基質であるヒストンにより分解され, 活性型酵素 C が増加したためと考えられた。

以上より心筋蛋白リン酸化酵素は dibutyryl cyclic AMP により *in vitro*, *in vivo* においても活性化され, 活性型酵素が増加することが認められた。

4. 心筋蛋白リン酸化酵素の細胞内分布と dibutyryl cyclic AMP のおよぼす影響

偽手術および dibutyryl cyclic AMP 100 mg 投与後に心尖部心筋を切除し, 4 倍の 0.25 M ショ糖を含む緩衝液で均質にした。1000 $\times g$ の遠心で核およびサルコレマを得, さらにその上清を 22,000 $\times g$ で遠心してミトコンドリア分画を得た。100,000 $\times g$ 遠心でマイクロゾーム及び可溶性分画を得た。各分画を 1% トライトン処理を行った。表 3 に対照群および dibutyryl cyclic AMP 投与群における可溶性分画および顆粒各分画の蛋白リン酸化酵素活性を示す。蛋白リン酸化酵

素総活性は対照および dibutyryl cyclic AMP 投与群でも可溶性分画、ミトコンドリア分画で高く、マイクロゾーム分画では最も低値であった。dibutyryl cyclic AMP 投与群ではホモジェネートの cyclic AMP 非添加時活性は対照と比べて有意に増加したが、顆粒各分画での cyclic AMP 非添加時活性の増減は明らかでなく、特に蛋白リン酸化酵素の1つの標的である心筋小胞体が存在するマイクロゾーム分画では蛋白リン酸化酵素活性は対照と比べて有意に変らなかった。

考 察

dibutyryl cyclic AMP を外因性に *in vivo* に投与した場合、持続性の心臓作用を有することは Kukovetz ら⁸⁾、Skelton ら⁹⁾、Ahren ら¹⁰⁾ により報告されている。正常犬を用いた実験では Cutilletta ら¹³⁾ は、冠動脈内に dibutyryl cyclic AMP 10 mg/分の投与により心拍数、心収縮力の増加を報告し、Okuaki¹⁴⁾ は、dibutyryl cyclic AMP 5~40 mg/kg の末梢静脈投与により用量依存性に陽性変時、変力作用、末梢血管の拡張を示したと報告している。冠動脈内に dibutyryl cyclic AMP を投与した著者の成績でも、末梢静脈投与よりも少量でカテコールアミンと同様に心拍数、最大 dP/dt、最大 dP/dt/P、冠血流量、心筋酸素消費量の増大を認めた。しかしながら dibutyryl cyclic AMP の最大効果の発現は投与後 15~20 分とカテコールアミンに比し長時間を要し、また著者の成績では 1.5 mg/kg 以上の冠動脈内投与量では心収縮力の増加は認められなかった。実験的心不全犬に末梢静脈より dibutyryl cyclic AMP を投与した松下ら¹⁷⁾ の成績においても、肺動脈楔入圧の低下、心拍出量増加の最大効果の発現は投与後 20 分であり、至適用量は 60 mg/kg で、それ以上ではプラトーとなり、心筋蛋白リン酸化酵素活性比 (C/(RC+C)) とも対応することが示されている。またこれらの心臓生理作用は β 受容体遮断剤によって抑制されなかった。

dibutyryl cyclic AMP は Castagna ら²¹⁾ により

dibutyryl cyclic AMP \rightarrow monobutyryl cyclic AMP \rightarrow monobutyryl AMP \rightarrow AMP \leftrightarrow ADP \leftrightarrow ATP

のような経路で代謝されることが報告されている。また、monobutyryl cyclic AMP より cyclic AMP に変換される系もあると考えられている。dibutyryl cyclic AMP 自体の蛋白リン酸化酵素に対する親和性は cyclic AMP と比べて低く、細胞内で代謝された monobutyryl cyclic AMP が cyclic AMP 結合蛋白と高い親和性を有し²²⁾、蛋白リン酸化酵素を活性化させることにより心臓生理作用を生じることが報告されて

いる²³⁾。また dibutyryl, monobutyryl cyclic AMP はともに cyclic AMP の水解酵素である phosphodiesterase の作用を受けにくく²⁴⁾²⁵⁾、競合阻害により細胞内 cyclic AMP の濃度を上昇させる。このように dibutyryl cyclic AMP の効果の遅延性および持続性は上記の代謝過程の遅延性、代謝産物の性質によると考えられる。

ペプチドホルモンの生理的、生化学的作用が cyclic AMP によって活性化された蛋白リン酸化酵素の特異的な基質蛋白のリン酸化を介して発現することは知られている。そのためホルモンの反応性を評価する上で蛋白リン酸化酵素活性比の算定が重要となる。Keely ら²⁶⁾ はラット灌流心にエピネフリンを投与した際、心収縮力と心筋 cyclic AMP 濃度、心筋蛋白リン酸化酵素活性比との間により相関を認めたと報告している。著者の成績においても dibutyryl cyclic AMP 投与量とともに蛋白リン酸化酵素活性比は増加し、その増加は *in vitro*, *in vivo* においても cyclic AMP 非添加時蛋白リン酸化酵素活性、すなわち catalytic subunit (活性型酵素) に基因した。このことは dibutyryl cyclic AMP の心臓生理作用が心筋蛋白リン酸化酵素の活性化を介して発現するといえよう。しかしながら蛋白リン酸化酵素活性比は dibutyryl cyclic AMP 投与量に比例して増加するにもかかわらず、陽性変力作用に dibutyryl cyclic AMP の至適量が存在した。このことは蛋白リン酸化酵素が多くの基質蛋白をリン酸化する非特異的な酵素であるがために、心収縮力に対する他の抑制機構の存在も否定できない。

陽性変力作用に関して cyclic AMP が *in vitro* で蛋白リン酸化酵素の活性化を通じて顆粒分画中のマイクロゾーム分画に存在する心筋小胞体膜の蛋白質成分をリン酸化し、それによって小胞体のカルシウムイオン能動輸送が促進され²⁷⁾、心筋の収縮力の増加がもたされることが報告されている²⁸⁾。Corbin ら²⁹⁾ は家兎灌流心にエピネフリンあるいはホモジェネートに cyclic AMP 投与後、cyclic AMP 濃度の上昇に伴い活性型酵素は顆粒分画では減少し、可溶性分画では増加したことより活性型酵素の顆粒分画より可溶性分画への translocation を推測した。Hayes ら³⁰⁾ も家兎灌流心にイソプロテレノール投与後、同様な活性型酵素の translocation と phosphorylase の活性化と左室 dP/dt の増加が一致することを述べ、蛋白リン酸化酵素の translocation がカテコールアミンの心臓生理作用発現に重要な役割を果たしていることを示唆している。

この蛋白リン酸化酵素の translocation については低イオン強度の緩衝液を使用した場合には、活性型酵素は高い等電点を有するため可溶性分画から顆粒分画

への非特異的な translocation が起こることが知られている³¹⁾。そこで著者の蛋白リン酸化酵素の細胞内分布についての実験でもこの非特異的な translocation をさけるために、Corbin ら²⁹⁾、Hayes ら³⁰⁾と同様の塩濃度 (0.25 M 塩化ナトリウム) の緩衝液を用いた。dibutyryl cyclic AMP 投与心筋の心筋ホモジェネートでは、cyclic AMP 非添加時活性の増加を認めるとともに、可溶性分画でもその増加傾向を認めた。一方、顆粒分画での cyclic AMP 非添加時活性の減少はサルコレンマ、ミトコンドリア、マイクロゾームの各分画で認められず、活性型酵素の translocation の現象を明らかにすることはできなかった。この点に関しては顆粒各分画の分画方法の問題、エピネフリン、イソプロテノールなどのカテコールアミンと dibutyryl cyclic AMP の顆粒分画での代謝機構の差異等に基くとも考えられ、今後更に検討する必要があると思われる。

結 論

dibutyryl cyclic AMP の心臓生理作用を明らかにするためにイヌ冠動脈内に dibutyryl cyclic AMP を投与し、心行動態、心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性におよぼす影響を検討した。

1. イヌ冠動脈内 dibutyryl cyclic AMP 投与は末梢静脈投与よりも少量で陽性変時、変力作用、冠血流量の増加を示し、その最大至適量は約 1.5 mg/kg であった。カテコールアミンと比べその作用発現は遅く、持続性を有した。

2. *in vitro*, *in vivo* の dibutyryl cyclic AMP の投与により可溶性分画の心筋蛋白リン酸化酵素は活性型酵素が増加し、投与量に比例して蛋白リン酸化酵素活性比 (総活性に対する活性型酵素の比) は増加した。以上より dibutyryl cyclic AMP の心臓生理作用は心筋蛋白リン酸化酵素の活性化を通じて発現すると考えられた。

3. この活性型酵素の増加は心筋ホモジェネートの顆粒分画より可溶性分画への translocation によると推定されたが、顆粒分画 (核およびサルコレンマ、ミトコンドリア、マイクロゾーム) の蛋白リン酸化酵素活性は dibutyryl cyclic AMP 投与群において対照と比べて変化なく、顆粒分画からの translocation を明らかにできなかった。

謝 辞

稿を終るに臨み、本研究の直接の御指導、御教示を賜りました養育院付属病院松下 哲循環器科長に深く謝意を表します。また御校閲を賜りました竹田亮祐教授、種々の

御支援、御教示を賜りました養育院付属病院村上元孝名誉院長、蔵本 築副院長、福井循環器病院三船順一郎副院長に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Sutherland, E. W., Robinson, G. A. & Butcher, R. W.: Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5'-monophosphate. *Circulation*, **37**, 279-306 (1968).
- 2) Brostrom, C. O., Corbin, J. D., King, G. A. & Kreds, E. G.: Interaction of the subunits of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase of muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2444-2447 (1971).
- 3) Rubin, C. S., Erlichman, J. & Rosen, O. M.: Molecular forms and subunit composition of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase purified from bovine heart muscle. *J. Biol. Chem.*, **247**, 36-44 (1972).
- 4) Robinson, G. A., Butcher, R. W., Oye, I., Morgan, H. E. & Sutherland E. W.: Effect of epinephrine on adenosine 3', 5'-phosphate levels in the isolated perfused rat heart. *Mol. Pharmacol.*, **1**, 168-177 (1965).
- 5) Rall, T. W. & West, T. C.: Potentiation of cardiac inotropic responses to norepinephrine by theophylline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **139**, 269-274 (1963).
- 6) De Gubareff, T. & Sleator, W.: Effect of caffeine on mammalian atrial muscle and its interaction with adenosine and calcium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **148**, 202-214 (1965).
- 7) Henion, W. F., Sutherland, E. W. & Posternak, Th.: Effects of derivative of adenosine 3', 5'-phosphate on liver slices and intact animals. *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 106-113 (1967).
- 8) Kukovetz, W. R. & Poch, G.: Cardiosimulatory effects of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate and its acylated derivatives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **266**, 236-254 (1970).
- 9) Skelton, C. L., Levey, G. S. & Epstein, S. E.: Positive inotropic effects of dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Circ. Res.*, **26**, 35-43 (1970).
- 10) Ahren, K., Hjalmarson, A. & Isaksson, O.: Inotropic and metabolic effects of dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in the perfused rat

heart. *Acta Physiol. Scand.*, **82**, 79-90 (1971).

11) **Drummond, G. I. & Hemmings, S. J.**: Inotropic and chronotropic effects of dibutyryl cyclic AMP, p 307-316, *In* P. Greengard & G. A. Robinson (ed.), *Advance in cyclic nucleotide research*, Vol. 1, Raven Press, New York, 1972.

12) **Imai, S., Otorii, T., Takeda, K., Katano, Y. & Horii, D.**: Effects of cyclic AMP and dibutyryl cyclic AMP on the heart and coronary circulation. *Japan. J. Pharmacol.*, **24**, 499-510 (1974).

13) **Cutiletta, A. F., Lin, C. Y., Thilenius, O. G. & Arcilla, R. A.**: Effect of dibutyryl cyclic AMP on myocardial performance in vivo, p 251-259, *In* N. S. Dhalla (ed.), *Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism*, Vol. 3, University Park Press, Baltimore, 1973.

14) **Okuaki, A.**: Effects of dibutyryl cyclic AMP on cardiac output and myocardial contractility in dogs. *Tohoku J. Exp. Med.*, **123**, 139-145 (1977).

15) 秋場 斉: 実験的心筋梗塞による心原性ショックの治療—カテコールアミン (dopamine, norepinephrine, isoproterenol) および dibutyryl cyclic AMP 投与時の犬血行動態におよぼす影響—, *昭和医学会雑誌*, **37**, 5-13 (1977).

16) 荻原英夫: エンド・トキシシンショック時の代謝および循環動態におよぼす dibutyryl cyclic AMP の効果, *東女医大誌*, **47**, 456-468 (1977).

17) 松下 哲・三船順一郎・萬木治人・坂井 誠・岩崎 勤・加藤洋一・蔵本 築・村上元孝: 実験的急性左心不全犬における dibutyryl cyclic AMP の強心効果と心筋 cyclic AMP 依存性たんぱくリン酸化酵素に対する影響, *代謝異常治療研究基金研究業績集*, **7**, 133-141 (1980).

18) 松井 忍・村上咲二・竹越 譲・村上英徳・升谷一宏・辻 外幸・茶谷 隆・江本二郎・的場宗敏: Dibutyryl cyclic AMP の心不全治療への応用, *心臓*, **15**, 206-214 (1983).

19) 坂井 誠: 心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性蛋白リン酸化酵素に関する研究 I. イヌ心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質, *金沢大学十全医学会雑誌*, **94**, 437-446 (1985).

20) **Corbin, J. D., Soderling, T. R. & Park, C. R.**: Regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1813-1821 (1973).

21) **Castagna, M., Palmer, W. K. & Walsh, D.**

A.: Metabolism of N^6, O^2 -[3H] dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and macromolecular interactions of the products in perfused rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 46-60 (1977).

22) **Kaukel, E. & Hilz, H.**: Permeation of dibutyryl cAMP into HeLa cells and its conversion to monobutyryl cAMP. *Biocem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1011-1018 (1972).

23) **Meinertz, T., Nawrath, H. & Schulz, H.**: Influence of cyclization and acyl substitution on the inotropic effects adenosine nucleotides. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **278**, 165-178 (1973).

24) **Posternak, Th., Sutherland, E. W. & Henion, W. F.**: Derivatives of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 558-561 (1962).

25) **Miller, J. P., Shuman, D. A., Scholten, M. B., Dimmit, M. K., Stewart, C. M., Khwaja, T. A., Robins, R. K. & Simon, L. N.**: Synthesis and Biological activity of some 2' derivatives of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate. *Biochemistry*, **12**, 1010-1016 (1973).

26) **Keely, S. L. & Corbin, J. D.**: Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of heart contractile force. *Am. J. Physiol.*, **233**, H269-275 (1977).

27) **Entman, M. L., Levey, G. S. & Epstein, S.**: Mechanism of action of epinephrine and glucagon on the canine heart. Evidence for increase in sarcotubular calcium stores mediated by cyclic AMP. *Circ. Res.*, **25**, 429-438 (1968).

28) **Laraia, P. J. & Morkin, E.**: Adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent membrane phosphorylation. A possible mechanism for the control of microsomal calcium transport in heart muscle. *Circ. Res.*, **35**, 298-306 (1974).

29) **Corbin, J. D., Sugden, P. H., Lincoln, T. M. & Keely, S. L.**: Compartmentalization of adenosine 3', 5'-monophosphate and adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J. Biol. Chem.* **252**, 3854-3861 (1977).

30) **Hayes, J. S., Brunton, L. L. & Mayer, S. E.**: Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E_1 . *J. Biol. Chem.*, **255**, 5113-5119 (1980).

31) **Keely, S. L., Corbin, J. D. & Park, C. R.**: On

the question of translocation of heart cAMP-dependent protein kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 72, 1501-1504 (1975).

Studies on myocardial cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase II. Effects of Intracoronary Injection of N⁶-2'-O-dibutyryl Adenosine 3', 5'-monophosphate on the Hemodynamics and Myocardial Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase in Dog Makoto Sakai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, and Department of Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo — J. Jusen Med. Soc., 94, 447-456 (1985).

Key words: catecholamine, cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP, myocardial cyclic AMP, myocardial cyclic AMP dependent protein kinase, positive inotropic effect.

Abstract

The present study was pursued to examine the effects of intracoronary injection of N⁶-2'-O-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate (dibutyryl cyclic AMP) on the hemodynamics and myocardial cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) dependent protein kinase in the dog. Dibutyryl cyclic AMP (1.2 to 1.5 mg/kg) infused *via* Gregg's cannula into the left coronary artery caused a gradual positive inotropic effect within a few minutes and revealed a peak effect at 15 to 20 minutes; 41% increase in heart rate, 310% increase in maximum dP/dt, 117% increase in maximum dP/dt/P, 100% increase in coronary blood flow and 69% increase in myocardial oxygen consumption. These effects persisted at least for 30 minutes. The dose response was observed until 1.5 mg/kg. At 30 minutes, a large apical mass of the heart was rapidly excised and immediately frozen in liquid nitrogen. A piece of anterior free wall was homogenized in ice cold potassium phosphate buffer (pH 7.0) with 0.25M NaCl. The supernatant was applied to a column of Sephadex G-100 to separate holoenzyme (RC) and free catalytic subunit (C) of cyclic AMP dependent protein kinase. The protein kinase activity ratios (C/(RC+C)) increased from 0.29 to 0.51 with increasing dibutyryl cyclic AMP infused. The protein kinase activity of various particulate fractions (nuclear, sarcolemmal, mitochondrial and microsomal fraction) showed no significant change. These findings suggest that the cardio-tonic effects of dibutyryl cyclic AMP are mediated through the activation of cyclic AMP dependent protein kinase, but do not support the hypothesis that the free catalytic subunit activated by dibutyryl cyclic AMP translocated from the particulate to the soluble fraction.